

1/9/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI  
(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007654978

WPI Acc No: 88-288910/198841

XRAM Acc No: C88-128312

XRPX Acc No: N88-219029

Collagenase inhibitor determin. - using combination of monoclonal antibodies binding specifically with different antigenic determinants of inhibitor, by enzyme immunoassay

Patent Assignee: FUJI YAKUHIN KOGYO KK (FUJY )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 63210665 A	19880901	JP 8742781	A	19870227		198841 B	
JP 2609858 B2	19970514	JP 8742781	A	19870227	G01N-033/577	199724	

Priority Applications (No Type Date): JP 8742781 A 19870227

Patent Details:

Patent	Kind	Lan Pg	Filing Notes	Application	Patent
JP 63210665 A	10				
JP 2609858 B2	8	Previous Publ.		JP 63210665	

Abstract (Basic): JP 63210665 A

Method of determining bovine and human-collagenase inhibitors comprises using a combination of two kinds of monoclonal antibodies binding specifically with different antigenic determinants of bovine collagenase inhibitor for determining them enzyme-immunologically by sandwich method. Pref. monoclonal antibodies binding specifically with different antigenic determinants of bovine collagenase inhibitor are used as antibody bound with a solid phase carrier and antibody labelled by enzyme. The carrier is e.g. polyethylene bead or microplate, stick, test tube, etc. made of polycarbonate, polypropylene, etc. Antibody labelled by enzyme is e.g. IgG fraction formed by the fractionation of antibody-contg. substance with ammonium sulphate and purificn. by anion-exchange gel e.g. DEAE-Sephacel, or specifically bound fraction Fab' obtd. by redn. after pepsin digestion. Antibody bound with the carrier is e.g. clone 7-23G9 antibody. The amt. of collagenase inhibitor in 1 ml of blood serum of healthy person is 0.29 microg. on average, compared to that in bovine blood serum. Amt. of collagenase inhibitor in blood plasma of smallpox patient is as small as about 1/3 times that in blood serum of healthy person.

ADVANTAGE - Collagenase inhibitors can be simply, rapidly, specifically and accurately determined with high sensitivity by

sandwich enzyme immunoassay using monoclonal antibodies to bovine collagenase inhibitor. The determin. can be carried out about a small sample.

0/0

Title Terms: COLLAGENASE; INHIBIT; DETERMINE; COMBINATION; MONOCLONAL; ANTIBODY; BIND; SPECIFIC; ANTIGEN; DETERMINE; INHIBIT; ENZYME; IMMUNOASSAY

Index Terms/Additional Words: POLYETHYLENE; POLYCARBONATE; POLYPROPYLENE

Derwent Class: A96; B04; D16; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/577

International Patent Class (Additional): C07K-015/04; C12N-015/00; C12P-021/00; C12R-001/91; G01N-033/57; G01N-033/573

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-V03C2; A12-W11L; B04-B04C5; B04-B04D4; B04-C03B ; B04-C03C; B11-C07A4; B12-G01B3; B12-K04A; D05-H09; D05-H10; D05-H11

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Plasdoc Codes (KS): 0231 0239 0248 1292 2533 2535 2541 2706 3272 3288

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 014 04- 041 046 047 050 143 155 157 158 393 488 490 53& 57& 623 624  
643 645 688 726

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M750 M903 N102 Q233 V803 V814  
\*02\* M423 M760 M903 N102 Q233 V600 V614  
\*03\* M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V600 V611 V752 V802 V810  
\*04\* G013 G019 G100 H401 H402 H441 H442 H721 L472 L499 M121 M129 M132  
M137 M139 M150 M210 M212 M213 M231 M280 M311 M312 M313 M314 M315  
M320 M323 M331 M340 M342 M423 M430 M510 M520 M530 M533 M540 M610  
M782 M903 N102 P831 Q233 V600 V611 V743 V752

Chemical Fragment Codes (M6):

\*05\* M903 P831 Q233 R160 R515 R521 R611 R621 R624 R631

## ⑪ 公開特許公報 (A)

昭63-210665

⑪ Int.Cl.  
 G 01 N 33/573  
 C 12 N 15/00  
 C 12 P 21/00  
 G 01 N 33/543  
 33/577  
 // C 07 K 15/04  
 (C 12 P 21/00  
 C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号  
 Z-7906-2G  
 C-8412-4B  
 D-6712-4B  
 U-7906-2G  
 A-7906-2G  
 8318-4H

⑬ 公開 昭和63年(1988)9月1日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑭ 発明の名称 コラゲナーゼインヒビターの酵素免疫学的定量法

⑮ 特 願 昭62-42781

⑯ 出 願 昭62(1987)2月27日

⑰ 発明者 小玉 修嗣 富山県高岡市東下関3番14号  
 ⑰ 発明者 岩田 和士 富山県高岡市五十里東町190番地  
 ⑰ 発明者 来住 準一 愛知県名古屋市瑞穂区山下通り5丁目5番地 ライオンズ  
 マンション瑞穂公園4棟15号  
 ⑰ 発明者 早川 太郎 愛知県名古屋市天白区天白町平針大堤下1355番地  
 ⑯ 出願人 富士薬品工業株式会社 富山県高岡市長慶寺530番地  
 ⑯ 代理人 弁理士 南 孝夫

## 明細書

1. 発明の名称 コラゲナーゼインヒビターの酵素免疫学的定量法

## 2. 特許請求の範囲

ウシコラゲナーゼインヒビターの異なる抗原決定基に対し、特異的に結合する2種類のモノクローナル抗体の組合せを用いてサンドイッチ法により酵素免疫学的に測定することを特徴とするウシコラゲナーゼインヒビターおよびヒトコラゲナーゼインヒビターの定量法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明はヒト及びその他の動物の骨、皮膚、筋肉、羊水、血液、慢性リウマチ関節液中及び歯槽、歯肉細胞、舌筋細胞、各種組織由来細胞、細胞内膜細胞培養液中のコラゲナーゼインヒビターを高感度に定量する方法に関するものである。さらに詳しくは、本発明は、ウシコラゲナーゼインヒビター(ティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテアーゼ: TIMP)に対するモノクローナル抗体を用いるサンドイッチ

法に基づく酵素免疫学的測定法によるウシコラゲナーゼインヒビターおよびヒトコラゲナーゼインヒビターの定量法を提供するものであつて、固相抗原に結合させる抗体及び酵素標識を付与する抗体としてウシコラゲナーゼインヒビターの異なる抗原決定基に対し特異的に結合する2種類のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするものである。

従来、コラゲナーゼインヒビターを定量する手段としては、その生物活性の測定による方法が知られている。しかしながら、J. Lab. Clin. Med. 75, 258 ~ 263 (1970) K. Biesenらが記載しているように血清中や血漿中にはコラゲナーゼインヒビター活性の測定を妨害する蛋白質、例えば $\alpha_2$ -マクログロブリンが存在するため、そのような場合にはコラゲナーゼインヒビター活性を正確に測定することは実質上不可能である。コラゲナーゼインヒビターを特異的に、精度よく、定量することができれば、コラゲナーゼインヒビター投与による疾患の治療の過程における

る血中のコラゲナーゼインヒビターの濃度の変動の測定(モニタリング)や医療用コラゲナーゼインヒビターの製造の際の原料中のコラゲナーゼインヒビターの含有量の解析あるいは製品におけるコラゲナーゼインヒビターの純度の測定などに極めて意義のあることとなる。

本発明者らは、ウシコラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体を用い、サンドイッチ法に基づく酵素免疫学的測定法(BIA)を行うことにより少量の試料で精度よく、簡便、迅速にコラゲナーゼインヒビターを特異的に定量する方法を完成した。

すなわち、本発明は、固相単体に結合させる抗体及び酵素標識を付与する抗体としてウシコラゲナーゼインヒビターの異なる抗原決定基に対し、特異的に結合するモノクローナル抗体を用い、酵素免疫学的測定法によりウシコラゲナーゼインヒビターおよびヒトコラゲナーゼインヒビターを定量する方法を提供するものである。

本発明方法を行うにあたつては、固相抗体と

ではない。

#### 実施例 1

##### ウシコラゲナーゼインヒビターモノクローナル抗体の作製

###### (a) 抗原 - ウシコラゲナーゼインヒビターの調製

J. Biochem. 96, 395 ~ 404 (1984)に記載の本発明者らの方法に従いウシ未萌出知齒の根部歯肉をイーグル $M$ EM培地(日本製葉製)で培養した培養上清からCon A - セフアロース、ウルトロゲル AcA 44およびDB-52セルロースの各カラムを用いてコラゲナーゼインヒビターを精製した。精製インヒビターはJ. Mol. Biol. 80, 579 ~ 599 (1973)に記載のLaemmliらの方法に従いドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で調べたところ分子量約32,000ダルトン(D)の単一バンドを示した。

###### (b) 抗体産生細胞の調製

6週令のBalb/c雌マウス2匹をまずフロインド完全アジュバント中で、前記(a)で記述した精

してポリスチレン製ビーズをはじめ、抗原や抗体を受動的に良く吸着するポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニール製のマイクロプレート、ステンレス、試験管など種々の担体を使用することができる。一方、酵素標識を付与する抗体としては、抗体含有物を確定分画後、DEAE-Sephadexの如き陰イオン交換ゲルにより精製した IgG 画分、更にはペプシン消化後、還元して得られる特異的結合部分 Fab'を用いることもできる。

本発明方法により、固相単体に結合させる抗体及び酵素標識を付与する抗体として、ウシコラゲナーゼインヒビターの異なる抗原決定基に対し、特異的に結合する2種類のモノクローナル抗体の組合せを用いて、固相法酵素免疫学的測定法によりウシコラゲナーゼインヒビターおよびヒトコラゲナーゼインヒビターを定量することができる。

以下実施例により本発明を具体的に説明する。ただし本発明はこれら実施例に限定されるもの

製ウシコラゲナーゼインヒビターで初回免疫する。マウスにそれぞれ48μgのウシコラゲナーゼインヒビターを0.4mlの溶液として腹腔内投与する。さらに30日目に生理食塩水に溶解した84μgのウシコラゲナーゼインヒビターを追加免疫する。最終免疫として58日目に腹腔内投与(95μg/500μl生理食塩水)により補助免疫し、3日後マウス脾臍を取り出し、脾細胞を調製する。

###### (c) 細胞融合

###### (i) 以下の材料および方法を用いる。

RPMI 1640 培地: RPMI 1640 (Difco Laboratories)に重炭酸ナトリウム(12mM)、ビルビン酸ナトリウム(1mM)、L-グルタミン(2mM)、ペニシリノーカリウム(50U/ml)、硫酸ストレプトマイシン(50μg/ml)、および硫酸アミカシン(100μg/ml)を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2mm東洋メンブレンフィルターで除菌済過する。

NS-1 培地: 上記 RPMI 1640 培地に除菌済過した

仔牛胎児血清 (M.A.Bioproducts) を 1.5% (v/v) の濃度に加える。

PEG 4,000 溶液： RPMI 1640 培地のポリエチレンタリコール 4,000 (PEG 4,000, Merck & CO., Inc.) 5.0% (w/v) 無血清溶液を調製する。

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞 NS-1 (P3-NS1-1) との融合は Selected Method in Cellular Immunology (ed. B.B.Mishell and S.M.Shiigi), W. H. Freeman and Company (1980), 351 ~ 372 頁記載の 01 らの方法を若干改変して行つた。

(2) 前記(b)で調製した有核肺臘細胞 (生細胞率 100%) とミエローマ細胞 (生細胞率 100%) とを 5 : 1 の割合で融合する。肺臘細胞とミエローマ細胞とを別に前記の RPMI 1640 培地で洗浄する。次に同じ培地にけん渦し、融合させるため上記の割合で混合する。容量 5.0 ml の円錐形ステロール樹脂製試験管 (Iwaki Glass) を用い、4.0 ml の RPMI 1640 培地中 400×8、10 分間遠心し、上清を完全に吸引除去する。沈殿細胞に 37℃ 加温 PEG 4,000 溶液 1.3 ml を穂やかに搅拌し

ながら 1 分間で滴下し、さらに 1 分間搅拌し細胞を再けん渦、分散させる。次に 37℃ 加温 RPMI 1640 培地 1.3 ml を 1 分間で滴下する。この操作をさらに 1 回繰返した後、同培地 9 ml を 2 ~ 3 分間で常に搅拌しながら滴下し細胞を分散させる。これを 400×8、10 分間遠心分離し、上清を完全に吸引除去する。次にこの沈殿細胞に 37℃ 加温 NS-1 培地 1.2 ml をすみやかに加え、細胞の大きい塊りを 1.0 ml のビペットを用いて注意深くピッティングして分散する。さらに同培地 2.6 ml を加えて希釈し、ポリスチレン製 96 穴マイクロウエル (Iwaki Glass) にウエル当たり  $6.0 \times 10^5$  個 / 0.1 ml の細胞を加える。なお、この時使用する 96 穴マイクロウエルは前処理として 0.2 ml の NS-1 培地を加え、炭酸ガス培養器中 (37℃) で一晩保温し、使用時に培地を吸引除去しておく。細胞を加えた上記のマイクロウエルを 7% 炭酸ガス / 93% 空気中で温度 37℃、湿度 100% 下に培養に付する。

(d) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増

### 殖

(1) 使用する培地は以下の通りである。

HAT 培地：前記(c)で述べた NS-1 培地にさらにヒボキサンチン (100 μM)、アミノブテリン (0.4 μM)、およびチミジン (16 μM) を加える。

HT 培地：アミノブテリンを除去した以外は上記 HAT 培地と同一組成のものである。

(2) 前記(c)の培養開始後翌日 (1 日目)、細胞にバスクールビベットで HAT 培地 2 滴 (約 0.1 ml) を加える。2, 3, 5, 8, 11 日目に培地の半分 (0.1 ml) を新しい HAT 培地で置き換える。14 日目に培地の半分を新しい HT 培地で置き換える。以降 3 ~ 4 日毎に培地の半分を新しい HT 培地で置き換える。通常 2 ~ 3 週間で充分なハイブリドーマの生育が観察される。ハイブリドーマ生育全ウエルについて次項(e)記載の固相 - 抗体結合テスト法 (ELISA) により陽性ウエルをチェックする。次にフィーダーとして  $10^7$  個のマウス胸腺細胞を含む HT 培地 1 ml をポリスチレン製 24 穴セルウエル (Iwaki Glass) に加えたものを用い、

上記で検出された各陽性ハイブリドーマの全内容物を移す。これを前記(c)におけると同様 IC 7% 炭酸ガス存在下、37℃ で約 1 週間培養に付する。その間 1 ~ 2 回各ウエルの上清 0.5 ml を新しい HT 培地 0.5 ml と交換する。ハイブリドーマの充分生育した時点で ELISA 法により陽性を再確認し、それぞれについて次項(e)記載の限界希釈法によるクローニングを行う。なお、クローニングに使用後の残液をポリスチレン製 25 ml<sup>3</sup> 組織培養フラスコ (Iwaki Glass) に移し、凍結保存用試料を調製する。

(e) 固相 - 抗体結合テスト (ELISA) による抗ウシコラゲナーゼインヒビター抗体産生ハイブリドーマの検索

Anal. Biochem. 104, 205 ~ 214 (1980) に記載の Rennard らの方法を若干改変した方法を用いる。この方法は、ハイブリドーマ抗体の検出に適している。96 穴マイクロタイトレーショントレー (Flow Laboratories, Inc.) を 0.5 ~ 1.0 ml のウシコラゲナーゼインヒビターでコートし、次に、

未コート部分を1%牛血清アルブミン(BSA)でブロックする。これに前記(d)で得られたハイブリドーマ生育ウエルの上清の一部を加えて室温で約1時間インキュベートする。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤマトマウスイムノグロブリン(cappel Lab.)を加え、さらに室温で約1時間インキュベートする。次に過酸化水素と基質であるO-フェニレンジアミンを加え生成した褐色の程度を肉眼で定性的に判定するか、あるいはコロナ2波長マイクロプレート光度計(MTP-22、コロナ電気社)を用いて500nmの吸光度を測定する。

#### (d) クローニング

前記(d)の操作後、各ウエル中には2種以上のハイブリドーマが生育している可能性があるので、限界希釈法によりクローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。NS-1培地当たり5mlとして10<sup>7</sup>個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウエルの36ウエル、36

は10~100μg/mlである)。一方、大量に抗体を得るために胸細胞とミエローマ細胞の由来動物と同系の動物(Balb/c、マウス)に腫瘍形成促進剤ブリスタン(2,6,10,14-テトラメチルベンタデカン、Aldrich Chemical社)をマウス一匹当たり0.5ml腹腔内投与し、1~3週間後に、各ハイブリドーマ1×10<sup>7</sup>個を同じく腹腔内投与することにより生体内で、さらに、1~2週間後、モノクローナル抗体たん白質濃度4~7mg/mlの腹水を得ることができる。

#### (e) モノクローナル抗体の重鎖、軽鎖及びアイソタイプ

前記(e)で得られた各々の腹水を先ずウシコラゲナーゼインヒビターをコートしたミクロタイトレーショングルートに前述したELISA法に従つて結合させる。PBSによる洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤマトマウスIgG抗体(Zymed Laboratories)を加える。PBSによる洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤマトマウスIgG(H+L)抗体を加え、基質として2,2'-アジノ

ウエルおよび24ウエルにウエル当たり5個、1個および0.5個のハイブリドーマを加える。5日目、12日目に全ウエルに各約0.1mlのNS-1培地を追加する。クローニング開始後14~15日で充分なハイブリドーマの生育が認められ、コロニー形成陰性ウエルが50%以上である群についてELISA法を行う。テストした全ウエルが陽性でない場合、抗体陽性ウエル中のコロニー数を確認し、ウエル中に1コロニーが確認されたウエルを4~6個選び再クローニングする。最終的にウシコラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ17株が得られた。

#### (f) モノクローナル抗体の生体外増殖および生体内増殖

モノクローナル抗体の増殖は常法による。すなわち、モノクローナル抗体は、得られた各ハイブリドーマをNS-1培地などの適当な培養液で培養(生体外増殖)し、その培養上清から得ることができる(モノクローナル抗体たん白濃度

~5(3-エチルベンゾチアゾリン硫酸-6)および過酸化水素を用いて検出した。その結果をまとめて後掲の第1表に示した。得られたウシコラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体の内15個が免疫グロブリン類型 $\tau 1/\tau$ を、1個が $\tau 2a/\tau$ を、そして、1個が $\tau 2b/\tau$ を有していた。

#### (g) モノクローナル抗体の精製

前記(f)で得られた各腹水を硫酸アミニン(40多量)後、塩化ナトリウム0.06Mを含む40mMリン酸緩衝液、pH8.0で平衡化したDEAE-Sephadex(pharmacia社)の非吸着画分を分取し、このIgG画分を更に0.42M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液、pH7.4で平衡化したSephacryl S-300Superfine(Pharmacia社)カラムでゲル通過し、培地中のFCSおよびマウス由来のたん白質を分離、除去した。

#### 実験例 2

ウシ骨髄コラゲナーゼインヒビターとモノクローナル抗体との交叉性

(a) 脱素標識モノクローナル抗体 (Fab'-POD複合体) の調製法

(1) Fab'画分の調製

実施例1(1)で得られた IgG 画分を 0.1 M 塩化ナトリウム含有 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) に溶解し、その溶液を以下述べるようにしてペプシンで消化した。すなわち、前記画分中の IgG に対して 2.2 % (w/w) のペプシンを加え、37°C、24時間消化した。更にその消化物に 2 M トリス溶液を加えて pH を 7.0 に調整することにより消化反応を停止させ、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したウルトロゲル AcA 44 カラム (LKB 製) を用いたゲル通過により Fab' 画分を分取した。

次に、この  $F(ab')_2$  画分をエナレンジアミン四酢酸 (EDTA) 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で透析し、終濃度 1.0 mM となるようにアミノエタンチオール (MEA) を加え 37°C で 1.5 時間還元した後、5 mM EDTA 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したウルトロゲル AcA 44

M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で希釈した。この混合液を 4°C、20 時間反応後、Fab' の 1.0 倍モル量の N-エチルマレイミドで未反応のチオール基をプロックした。これを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したウルトロゲル AcA 44 カラムでゲル通過し、Fab' - POD 複合体画分を分取後、0.1 % 牛血清アルブミン (BSA) 及び 0.005 % チメロサールを添加し、4°C で保存した。

(b) ウエスタンプロットティング

実施例1(a)項で精製したウシ骨髄コラゲナーゼインヒビターを SDS-PAGE に供した後、市販の POD 標識ヤギ抗体マウス免疫グロブリンおよび上記実施例2(a)で得られた Fab'-POD 複合体を用いて細胞工学 1 号 2、1061 ~ 1066 (1983) に記載の田部の方法に従つてウエスタンプロットティングを行い、酵素抗体染色のパターンを得た。これを第1図に示す。第1図において、A 及び B はウエスタンプロットティング後のニトロセルロース膜をそれぞれ実施例2(b)で得られた Fab' (クローン 7-3F1) - POD 複合体及び Fab' (クローン 7-21B12) - POD 複合体で免疫染色した結果を示すものである。

カラムを用いてゲル通過し、Fab' 画分を分取した。

(2) マレイミド標識 POD 画分の調製

上記(1)の操作とは別に、以下述べるようにして西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (POD) IC マレイミドを標識した。すなわち、POD を 10 mg/ml の量で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、その POD に対して、2.5 倍モル量の N-(2-マレイミドカブロイルオキシ)コハク酸イミド (EMCS) をジメチルホルムアミド溶液として加え、30°C、30 分間反応させた。これを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセフアデックス 0-50 カラムでゲル通過し、マレイミド標識 POD 画分を分取した。

(3) Fab' - POD 複合体画分の調製

上記(1)の如くして調製した画分中の Fab' に対して上記(2)で得られた画分中のマレイミド標識 POD として等モルになるようにして、両画分を混合し、更に Fab' およびマレイミド標識 POD の終濃度が 100 μM となるよう 5 mM EDTA 含有 0.1

ローン 7-21B12) - POD 複合体で免疫染色した結果を示すものである。

また、1 ~ 16 は下記の各モノクローナル抗体 (いずれも IgG タイプ) の溶液にウエスタンプロットティング後のニトロセルロース膜を浸した後、あらためて各ニトロセルロース膜を POD 標識ヤギ抗体マウス免疫グロブリン (Cappel Laboratories 製) で免疫染色した結果を示すものである。

1 : クローン 7-3F1、2 : クローン 7-4F2、3 : クローン 7-5A1、4 : クローン 7-6C1、5 : クローン 7-7F11、6 : クローン 7-8B2、7 : クローン 7-9B4、8 : クローン 7-10B11、9 : クローン 7-11A5、10 : クローン 7-12B6、11 : クローン 7-15B8、12 : クローン 7-18F3、13 : クローン 7-19F6、14 : クローン 7-20C2、15 : クローン 7-21B12、16 : クローン 7-23D9

第1図に示されるところから明らかのように、上記のモノクローナル抗体は、いずれもウシ骨髄コラゲナーゼインヒビターと交叉することが

わかつた。

### 実施例 3

#### サンドイッチ酵素免疫測定法

##### (a) モノクローナル抗体結合ポールの調製法

J. Immunoassay 4, 209 ~ 327 (1983) に記載の石川らの方法に従つて実施例 1 (i) で得られたモノクローナル抗体を 0.1 M アジ化ナトリウム含有 0.1 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、それを 100 µg/ml ( $A_{280} = 0.15$ ) の濃度に調整した後、そのモノクローナル抗体溶液にポリスチレンポール (径 6.5 mm, Precision Plastic Ball 製) を浸漬し、4 °C で 24 時間静置した。次にモノクローナル抗体溶液を除去した後、0.1 M BSA、0.1 M 塩化ナトリウム及び 0.1 M アジ化ナトリウム含有 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) (以下緩衝液 A と略記する) で 5 回洗浄した後、緩衝液 A に浸し、4 °C で保存した。

##### (b) サンドイッチ測定法

精製したコラゲナーゼインヒビター溶液、あるいはコラゲナーゼインヒビターを含む試料溶液を用いて実施例 3 (b) の方法によりサンドイッチ測定を行つた。

#### 選択

コラゲナーゼインヒビターを定量することができるモノクローナル抗体の組合せを探す目的で実施例 1 (i) の方法で調製したクローン 7-3F1、7-6C1、7-19F6 及び 7-21B12 の各モノクローナル抗体から Fab'-POD 複合体を調製した。一方、クローン 7-3F1、7-4F2、7-5A1、7-6C1、7-7F11、7-8B2、7-9B4、7-10E11、7-11A5、7-12B6、7-15E8、7-18F3、7-19F6、7-20C2、7-21B12、及び 7-2309 の各モノクローナル抗体を固相として、試験管当たり 1 µg の精製したウシ歯髓コラゲナーゼインヒビターを用いて実施例 3 (b) の方法によりサンドイッチ測定を行つた。得られた  $A_{450}$  値を第 2 表 (後掲) に示す。

なお、第 2 表中の  $A_{450}$  値は試料 1 µg 添加の値からコラゲナーゼインヒビターを添加しない時の値を差し引いた数値である。上記 4 種類のいずれの Fab'-POD 複合体を用いた場合においても、固相として 7-4F2、7-11A5、7-12B6、7-18F3、7-20C2、及び 7-2309 の 6 種類の抗体を用いた時

液を 1 % BSA を含む緩衝液 A で希釈し、各試験管に 300 µl 加えた。次に前記 (a) 項で調製した抗体結合ポールを加え、37 °C で 1 時間振とう加温後 (第 1 反応)、0.1 M 塩化ナトリウム含有 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 3 ml で各試験管を 3 回洗浄した。次に実施例 2 (a) 項で調製した Fab'-POD 複合体を 2.0 µg/試験管となるよう 0.1 M BSA 及び 0.1 M 塩化ナトリウム含有 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し 30 °C で 1 時間振とう加温した (第 2 反応)。反応終了後、第 1 反応終了時と同様に洗浄した。次に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解した POD 基質、すなわち 0.0134 M ナトラメチルペニシリン (TMBZ) を 0.3 ml 加え、更に 0.01 M 過酸化水素 0.1 ml を加えて 30 °C で 1 時間振とう加温 (第 3 反応) 後、133 N 鹽酸 0.6 ml を添加することにより反応を停止させた。その反応溶液の  $A_{450}$  値を分光光度計で測定し、標準直線より試料中のコラゲナーゼインヒビター量を求めた。

##### (c) サンドイッチ測定用モノクローナル抗体の

の  $A_{450}$  が 2 以上の値を示した。次にこれら 24 通りの組合せについて、ウシ歯髓コラゲナーゼインヒビターの添加量を変えてサンドイッチ定量を行つた。Fab' (クローン 7-3F1)-POD を複合体とし、クローン 7-4F2 抗体を固相とした場合に得られた結果を第 2 図に示す。第 2 図に見られるように、添加したウシ歯髓コラゲナーゼインヒビター量と  $A_{450}$  の間に直線関係が成立し、定量感度は試験管当たり約 0.6 µg (19 amol) であった。上記以外の組合せについても上記の直線関係が見られ、いずれの組合せについてもサンドイッチ定量が可能であることがわかつた。

#### 実施例 4

血清中あるいは血漿中のコラゲナーゼインヒビターの同定

##### (a) アフィニティカラムの調製

Nature 214, 1302 ~ 1304 (1967) に記載の Axén ら及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 636 ~ 643 (1968) に記載の Cuatrecasas らの方法に従つて臭化シアンを介して抗体のセフアロース 4B にリガ

ンドとして実施例1(d)で得られた精製モノクローナル抗体を固定化した。次に抗体結合セファロース4Bゲル0.3mlをガラス管に充填し、0.1M塩化ナトリウム及び5mM塩化カルシウム含有3.0mMトリス-塩酸緩衝液で平衡化し使用した。

(d) コラゲナーゼインヒビターのアフィニティ精製

健常人血清及び天疱瘡患者血漿、ならびにウシ血清各1mlを0.1M塩化ナトリウム及び5mM塩化カルシウム含有3.0mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に對して透析した後、上記(d)項記載の方法に従つて調製したクローン7-21B12抗体結合セファロース4Bカラムに供し、上記緩衝液で洗浄し(非吸着画分)、次にカラムを2M塩化ナトリウム含有3.0mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)及び0.5M塩化ナトリウム含有0.2Mグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH11.0)で順次洗浄し(洗浄画分)、最後にカラムに吸着した蛋白質を0.2Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.0)で溶出した(溶出画分)。後掲の第3表

ヒビターのそれと同じ32,000Dであることがわかつた。

(e) サンドイッチ測定法によるウシ血清中及びヒト血清中のコラゲナーゼインヒビターの定量

実施例3(c)項に示したモノクローナル抗体の組合せについてサンドイッチ定量を行い、ウシ血清中及びヒト血清中のコラゲナーゼインヒビター量を測定した。その結果を第4表(後掲)に示す。

なお、このサンドイッチ定量において、標準直線の作製には抗原として実施例1(d)項で精製したウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターを用い、また、血清を測定する場合には1%BSAを含む緩衝液Aで1000倍、2000倍、4000倍及び8000倍にそれぞれ希釈してサンドイッチ定量を行い、それらの平均値を第4表中に示した。ウシ血清の場合、測定に供したいずれの組合せについても血清中のコラゲナーゼインヒビターを定量でき、それらの平均値は血清1ml当たり

に示した如く健常人血清(ヒト血清)、天疱瘡患者血漿及びウシ血清を用いた時の溶出画分にそれぞれ2.0、1.8及び7.1mgの蛋白質が得られた。なお、これらの溶出画分をSDS-PAGEに供したところ、多數のバンドが認められた。これらのバンドのうち、コラゲナーゼインヒビターに相当するバンドを確認するためウエスタンプロットを行つた。その結果を第3図に示す。第3図に示したように、A:健常人血清、B:天疱瘡患者血漿及びC:ウシ血清を用いて得られた溶出画分をSDS-PAGEに供した後、1:クローン7-3P1、2:クローン7-6C1、3:7-19P6及び4:7-21B12の各モノクローナル抗体から調製したFab'-POD複合体を用いてウエスタンプロットを行つた結果、いずれの血清中及び血漿中にもウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体と反応するコラゲナーゼインヒビターが存在することがわかつた。しかも、それらの分子量はいずれも実施例1(d)項で得られたウシ歯髄コラゲナーゼインヒ

0.28mgであつた。一方、ヒト血清の場合、測定に供したほとんどの組合せでA<sub>450</sub>は全く検出されなかつたが、固相用抗体としてクローン7-2309抗体、複合体としてFab'(クローン7-6C1)-PODを用いた場合、サンドイッチ定量可能であることがわかつた。

次に上記の組合せを用いて、健常人血清(ヒト血清)5検体、肝臓癌患者血清2検体及び天疱瘡患者血漿2検体の中に存在するコラゲナーゼインヒビターをサンドイッチ定量した。その結果を第5表(後掲)に示す。第5表に示したように、健常人血清1ml中に存在するコラゲナーゼインヒビター量は平均0.29mgであり、ウシ血清中のその量とほぼ同じ値を示した。また、天疱瘡患者血漿中のコラゲナーゼインヒビターの量は健常人血清中のそれに比べて約1/3と明らかに少ないとわかつた。

第 1 表

クローン番号	サブクラス/類
7-3F1	IgG1/α
7-4F2	IgG1/α
7-5A1	IgG1/α
7-6C1	IgG1/α
7-7F11	IgG1/α
7-8B2	IgG2a/α
7-9B4	IgG1/α
7-10E11	IgG1/α
7-11A5	IgG1/α
7-12B6	IgG1/α
7-14E9	IgG1/α
7-15E8	IgG1/α
7-18P3	IgG2b/α
7-19P6	IgG1/α
7-20C2	IgG1/α
7-21B12	IgG1/α
7-23O9	IgG1/α

第 3 表

蛋白質量 (μg/蛋白質 1 ml)		
	ヒト血清	ヒト血漿(天冬酰)
カクム酵素	64000	54700
神経過剤分	60700	54700
皮膚過剤分	80	26
筋肉過剤分	20	18
		7.1

第 4 表

固相用抗体	Fab'-POD 混合体			αβ/αγ (血清)		
	1 IgG1 (7-3F1)	1 IgG1 (7-6C1)	1 IgG1 (7-19P6)	1 IgG1 (7-21B12)	ヒト血清	ヒト血漿
1 IgG1 (7-4F2)	0.28	0	0.24	0	0.25	0
1 IgG1 (7-11A5)	0.27	0	—	—	—	0.30
1 IgG1 (7-12B6)	0.29	0	—	—	—	0.36
1 IgG2a (7-18P3)	0.28	0	—	—	—	0.25
1 IgG1 (7-20C2)	0.28	0	—	—	—	0.21
1 IgG1 (7-23O9)	—	—	0.31	0.29	0.24	0
平均	0.28		0.28		0.25	0.24

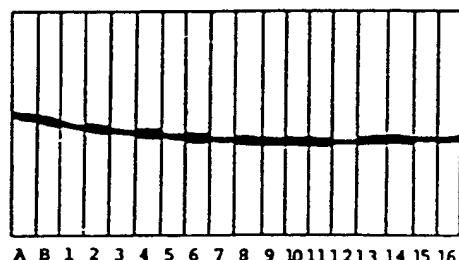
ヒト血清 (肝臓) ヒト血漿 (天冬酰)		
0.20	0.32	0.10
0.27	0.52	0.12
0.29 (0.29±0.04)		
0.20	—	
0.27	0.52	0.12
0.33		
0.58		

固相用抗体	Fab'-POD 混合体			αβ/αγ (血清)		
	1 IgG1 (7-3F1)	1 IgG1 (7-6C1)	1 IgG1 (7-19P6)	1 IgG1 (7-21B12)	ヒト血清	ヒト血漿
1 IgG1 (7-3P1)	0.11	—	1.98	2.25	2.68	2.68
1 IgG1 (7-4P2)	—	3.14	4.61	4.54	3.08	3.08
1 IgG1 (7-5A1)	3.25	0.010	0	0	0	0
1 IgG1 (7-6C1)	2.15	0.01	0.01	0.01	0	0
1 IgG1 (7-7P1)	0.125	0.23	0.102	0.067	0.067	0.067
1 IgG2a (7-8B2)	0	1.967	1.064	1.288	1.288	1.288
1 IgG1 (7-9B4)	0.196	0.057	0.029	0.020	0.020	0.020
1 IgG1 (7-10B1)	0.891	0.07	0.001	0.002	0.002	0.002
1 IgG1 (7-11A5)	3.40	4.45	4.26	4.26	4.26	4.26
1 IgG1 (7-12B6)	3.60	4.08	2.95	2.95	2.95	2.95
1 IgG1 (7-15B8)	0.313	0.781	0.587	0.587	0.587	0.587
1 IgG2a (7-18P3)	3.362	4.735	3.114	3.114	3.114	3.114
1 IgG1 (7-19P6)	1.066	0	0	0.004	0.004	0.004
1 IgG1 (7-20C2)	3.277	4.553	3.355	3.355	3.355	3.355
1 IgG1 (7-21B12)	2.107	0.02	0.003	0.003	0.003	0.003
1 IgG1 (7-23O9)	3.622	4.386	3.027	3.027	3.027	3.027

## 4. 図面の簡単な説明

第1図はウシ骨髄コラゲナーゼインヒビターをSDS-PAGEに供した後、種々のモノクローナル抗体を用いた時のウエスタンプロットティングパターンを示す図であり、第2図は固相7-4F2抗体-複合体Fab'(7-3F1)-POD測定系でのウシ骨髄コラゲナーゼインヒビターの標準直線を示す図であり、第3図は(A)ヒト血清(健常人)、(B)先天免疫患者血漿及び(C)ウシ血清をそれぞれモノクローナル抗体(7-21B12)結合セフアロース4Bカラムからの溶出画分のウエスタンプロットティングパターンを示す図である。

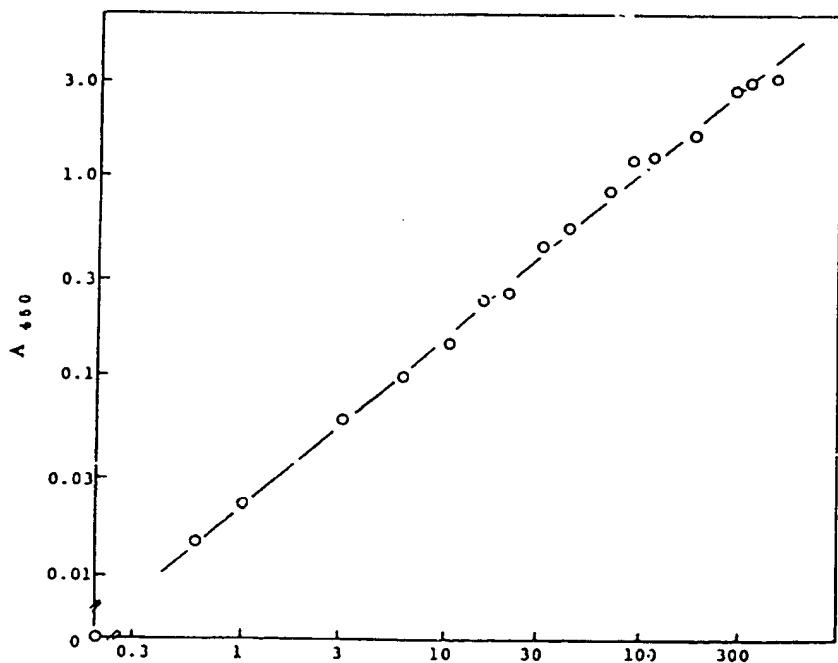
第 1 図



特許出願人 富士薬品工業株式会社

代理人弁理士 岩 孝夫

第 2 図



ウシ骨髄コラゲナーゼインヒビター (pM/テュープ)

第 3 図

